

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-541011

(P2008-541011A)

(43) 公表日 平成20年11月20日(2008.11.20)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|-----------------------|-------------|
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 Z | |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 2 5 W | |
| GO 1 N 33/545 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 2 5 U | |
| GO 1 N 33/547 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 2 5 E | |
| GO 1 N 37/00 (2006.01) | GO 1 N 33/545 | |

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-508733 (P2008-508733)
 (86) (22) 出願日 平成17年7月1日(2005.7.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月30日(2007.10.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2005/002096
 (87) 国際公開番号 W02006/121230
 (87) 国際公開日 平成18年11月16日(2006.11.16)
 (31) 優先権主張番号 10-2005-0038077
 (32) 優先日 平成17年5月6日(2005.5.6)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

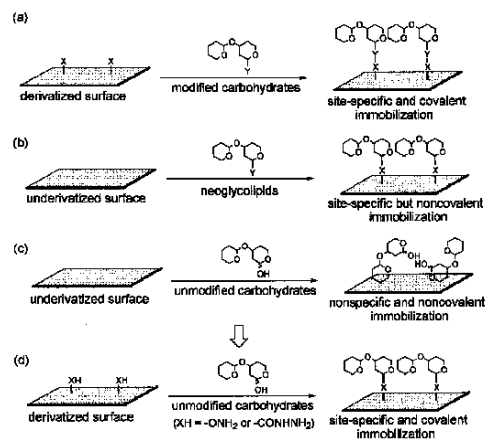
(71) 出願人 506148970
 ヨンセイ ユニバーシティ インダストリー
 アカデミック コオペレーション
 ファンデーション
 大韓民国 ソウル ソデムング シンチョ
 ンドン 1 3 4
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (72) 発明者 シン、イン-チェ
 大韓民国 4 1 2 - 2 7 0 コヤン トギ
 ヤング ファジョン-ドン オクビット
 マール アパートメント 7 0 4 - 1 3
 0 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 誘導体化された固体表面上への非修飾の炭水化物の固定による炭水化物チップの製作およびその用途

(57) 【要約】

本発明は、遊離した炭水化物が、修飾された固体表面上に固定された炭水化物チップの製作に関するものである。さらに詳しくは、本発明はヒドラジド基またはアミノオキシ基によって誘導体化された固体表面上に、非修飾の炭水化物が、その大きさに関係なく部位特異的に、および共有的に結合した炭水化物チップの製作方法に関するものである。本発明によると、非修飾の炭水化物が、その大きさに関係なく固体表面上に効率的に固定され、本発明の方法は修飾された炭水化物を必要としないため、炭水化物チップを製作し易い。さらに本発明は、炭水化物-蛋白質相互作用の迅速な分析および炭水化物に基づく疾病の診断のために製作された炭水化物チップの用途に関するものである。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 炭水化物が結合する官能基によって誘導体化された固体基質を製作する段階、
 (i i) 前記誘導体化された固体表面上に、リンカーを使わず非修飾の炭水化物を印刷する段階、および

(i i i) 前記固体表面と前記炭水化物とを反応させて部位特異的に、および共有的に炭水化物を固定化させる段階を含む、炭水化物チップの製作方法。

【請求項 2】

前記 (i) 段階の官能基は、ヒドラジド基またはアミノオキシ基であることを特徴とする請求項 1 に記載の炭水化物チップの製作方法。

10

【請求項 3】

前記固体表面上においてヒドラジドまたはアミノオキシに接続されたリンカーは、原子数 10 を超える長さの、ヘテロ原子が挿入された複数の炭化水素鎖で構成される群から選択されることを特徴とする請求項 2 に記載の炭水化物チップの製作方法。

【請求項 4】

前記炭化水素鎖は非分岐であり、25 から 55 の原子数を有することを特徴とする請求項 3 に記載の炭水化物チップの製作方法。

【請求項 5】

前記固体表面は、シリコン、高分子、雲母、プラスチック、ガラス、金、紙、膜またはこれらの組み合わせで構成される群から選ばれることを特徴とする請求項 1 から請求項 4 に記載の炭水化物チップの製作方法。

20

【請求項 6】

前記非修飾の炭水化物は、単糖類、二糖類、オリゴ糖および多糖類で構成される群から選ばれた、天然の、または化学的もしくは酵素的に製造された炭水化物であることを特徴とする請求項 1 に記載の炭水化物チップの製作方法。

【請求項 7】

前記 (i i) 段階における前記非修飾の炭水化物の印刷は、マイクロピペットまたはマイクロアレイヤを用いて行われることを特徴とする請求項 1 に記載の炭水化物チップの製作方法。

【請求項 8】

前記 (i i i) 段階における前記固体基質上に前記炭水化物を部位特異的に、および共有的に固定化させる工程は、固体表面上で炭水化物を 40 ~ 60 の温度で 8 時間以上反応させることにより行われることを特徴とする請求項 1 に記載の炭水化物チップの製作方法。

30

【請求項 9】

標識または非標識の検出システムで分析する工程を含む、請求項 1 に従って製作された炭水化物チップ上で蛋白質に結合した炭水化物を検出する方法。

【請求項 10】

前記非標識の検出システムは、質量分析計および表面プラズモン共鳴撮像装置で構成された群から選択されることを特徴とする請求項 9 に記載の炭水化物の検出方法。

40

【請求項 11】

前記標識検出システムは、走査系器具および CCD カメラを用いた器具で構成された群から選択されることを特徴とする請求項 9 に記載の炭水化物の検出方法。

【請求項 12】

前記試料は、ヒトまたは動物の、組織または血液、血清、尿、乳、汗、骨髄およびリンパ液で構成された群から選択された体液であることを特徴とする請求項 9 に記載の炭水化物の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、遊離した炭水化物が、修飾された固体表面上に固定された炭水化物チップの製作に関するものである。さらに詳しくは、本発明は、ヒドラジド基またはアミノオキシ基によって誘導体化された固体表面に、非修飾の炭水化物がその大きさに関係なく部位特異的に、および共有的に結合した炭水化物チップの製作方法に関するものである。さらに本発明は、これらの、炭水化物 - 蛋白質相互作用の迅速な分析、および病原菌、癌およびその他等の検出による炭水化物に基づく疾病の診断のための用途に関するものである。

【背景技術】

【0002】

機能的糖鎖と呼ばれる炭水化物の機能に関する研究は、生物学的研究および生物医学の応用のために大きな注目を浴びてきた。細胞表面は、糖蛋白質および糖脂質等の複合糖質の形態で主に存在する様々な構造のグリカンで覆われている。前記細胞表面の炭水化物は、蛋白質との特異的相互作用を通じた、細胞間情報交換、細胞付着、受精、発生、分化、および免疫反応を含む生物学的に重要な様々な過程に参与する。また、これらの相互作用は、有害な疾病の過程にも関連している。例えば、バクテリアまたはウイルスが宿主細胞に付着し病原性特性を付与することは、このような相互作用を通じて行われる。さらに、腫瘍の転移および炎症もまた、炭水化物 - 蛋白質の認識過程を通じて行われる。そのため、腫瘍細胞または病原菌に特異的に発見される、炭水化物、または炭水化物に結合する蛋白質は度々、それらの診断のためのマーカーとして利用される。よって、グリカン - 蛋白質相互作用に関する分子的基础に対する説明は、癌および病原菌の検出のための新規な診断の開発だけでなく、抗癌剤、抗生剤、抗ウイルス剤および抗炎症剤等の強力な生物学治療剤の開発の助けとなる。

10

20

【0003】

炭水化物 - 蛋白質相互作用における詳細な内容は、従来は生物物理学的または生化学なアプローチによって研究されていた。これらの方法はこのような相互作用の理解には大きく寄与したが、これらは蛋白質と炭水化物と間の相互作用の迅速な分析には適していない。よって、短時間で多数の試料を同時に検査できる炭水化物チップが要求されていた [Shin, I. et al., Chem. Eur. J. 2005, 11, 2894; Shin, I. et al., Combinatorial Chemistry and High-Throughput Screening 2004, 7, 565; Feizi, T. et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 2003, 13, 637]。

【0004】

炭水化物チップは、生物学的研究および生物医学的応用に適用されてきた：1) グリカン - 蛋白質相互作用のハイスループット分析、2) グリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、およびその他等の炭水化物 - プロセシング酵素の迅速な特性分析、3) 炭水化物および蛋白質間の親和性結合の定量的測定、4) 炭水化物 - 蛋白質相互作用を抑制する阻害剤のハイスループットスクリーニング、5) 糖蛋白質に結合したグリカンの分析、および6) 癌または病原菌の診断。

30

【0005】

炭水化物チップの製作に関する従来の方法は、1) 適当に誘導体化された固体表面上に、修飾された炭水化物を部位特異的に、および共有的に固定化させる方法 [図1(a)参照]、2) 非誘導体化の固体表面上にネオ糖脂質を部位特異的であるが非共有的に固定化させる方法 [図1(b)参照]、および3) 非誘導体化の固体表面上に非修飾の炭水化物を非特異的に、および非共有的に固定化させる方法 [図1(c)参照]である。先の二つの方法は、表面上への炭水化物の効率的な固定化を表すが、時折、合成が非常に困難で長時間を要する修飾された炭水化物を必要とする。三つ目の方法は、多糖類チップの製作には適するが、単糖類、二糖類、またはオリゴ類等の小さな炭水化物の結合には非効率的だという短所を有する。

40

【0006】

そのため、炭水化物チップの製作のためのこのような制限を克服するための、より効率的な方法がこれらの様々な応用のために必要となる。本発明者らは、ヒドラジド基またはアミノオキシ基によって誘導体化された固体表面上に、様々な非修飾の炭水化物をその大

50

きさに関係なく効率的に固定化させる方法を開発し[図1(d)参照]、よって、炭水化物-蛋白質相互作用を迅速に測定し、病原菌および癌の検出に利用できる炭水化物チップを製作した。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、様々な非修飾の炭水化物が、その大きさに関係なく部位特異的に、および共有的に固定化可能な炭水化物チップの製作方法を提供すること、および炭水化物-蛋白質相互作用を迅速に分析することによる前記炭水化物チップの生物学的研究および生物医学的応用への用途を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

前記炭水化物チップの製作は、(i)炭水化物が結合する固体表面を修飾させる段階；(ii)前記誘導体化された固体表面上に非修飾の炭水化物を印刷する段階；および(iii)前記炭水化物を前記修飾された固体表面と反応させて部位特異的に、および共有的に固体表面上に前記炭水化物を固定化させる段階を含む。前記製造された炭水化物チップは、炭水化物-蛋白質相互作用を迅速に分析するのに使用されるとともに、病原菌、癌およびその他等を検出することによって炭水化物に基づく疾病の診断に用いられる。

【0009】

また本発明は、標識または非標識の検出システムを含む前記方法によって製造された、表面上に固定された炭水化物に結合した蛋白質の検出方法を提供する。

20

【0010】

さらに本発明は、本発明によって製造された炭水化物チップを用いて炭水化物に基づく疾患を診断する方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明において、好ましくは、前記(i)段階の官能基はヒドラジド基またはアミノオキシ基である。

【0012】

本発明において、好ましくは、前記固体表面は、シリコン、高分子、雲母、プラスチック、ガラス、金、紙、膜、およびこれらの組み合わせで構成される群から選択される。

30

【0013】

前記非修飾の炭水化物は、天然の、または化学的もしくは酵素的に製造された炭水化物であり、好ましくは、前記炭水化物は単糖類、二糖類、オリゴ糖および多糖類で構成される群から選択される。ここで、前記単糖類は、より好ましくはグルコース(Glc)、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、グルクロン酸(GlcA)、ガラクトース(Gal)、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、マンノース(Man)、N-アセチルマンノサミン(ManNAc)、フコース(Fuc)、ラムノース(Rham)およびキシロース(Xyl)で構成される群から選択され、前記二糖類は、より好ましくはマルトース、セロビオース、N,N'-ジアセチルキトビオース、ラクトース、ガラクトース-1,4-N-アセチルグルコサミン(Gal-1,4GlcNAc; LacNAc)およびマンノース-1,6-マンノース(Man-1,6Man; マンノビオース)で構成される群から選択され、前記オリゴ糖は、より好ましくはFuc-1,3(Gal-1,4)Glc(FucLac)、NeuNAc-2,3Gal-1,4GlcNAc(NeuNAcLacNAc)、シアリルLe^xおよびFuc-1,2Gal-1,3(Fuc-1,4)GlcNAc-1,3Gal-1,4Glcで構成される群から選択され、前記多糖類は、より好ましくはマンナンである。

40

【0014】

本発明において、好ましくは、前記(ii)段階における前記非修飾の炭水化物の印刷は、マイクロピペットまたはマイクロアレイヤを用いて行われる。

50

【0015】

本発明において、好ましくは、前記(iii)段階の固体表面上に前記炭水化物を部位特異的に、および共有的に結合させるための工程は、前記印刷されたプレートを40～60で8時間以上インキュベートすることにより行われる。

【0016】

図2は本発明の原理を説明する。まず、様々な長さのリンカーを経由して、ヒドラジド基またはアミノオキシ基によって被覆されたチップ基盤を図3に提示した通りに製造する。

好ましくは、固体表面上のヒドラジド基またはアミノオキシ基に接続された前記リンカーは、複数の炭化水素鎖で構成される群から選択され、好ましくは、原子数10を超える、ヘテロ原子が挿入された非分岐鎖であり、好ましくは20～55の原子を含む。

より具体的に、アミノオキシ誘導体化チップ基盤は、アミンチップ基盤が化合物bと反応した後、または長いリンカーaもしくはcと反応した後に化合物bが結合した後、ヒドラジドを用いた処理によって表面にヒドラジド基が導入されることにより製造され(図3の(a)参照)、一方ヒドラジドチップ基盤は、アミンチップ基盤が6-アミノヘキサン酸ヒドラジドと反応することによって、または長いリンカーaもしくはbと反応した後に保護基が除去されることにより製造される(図3の(b)参照)。

【0017】

30～50%グリセロールを含むPBS緩衝溶液(pH4.0～5.0)中の、単糖類、二糖類、オリゴ糖および多糖類を含む炭水化物溶液(0.1μl～1nl)が、マイクロピペットまたはマイクロアレイヤを用いて前記チップ基盤上に印刷される。この工程で、前記炭水化物の濃度は、好ましくは0.1～50mMである。印刷が終わった後に、前記チップを40～60で8時間以上反応させた後に洗浄する。その後、チップを0.1%Tween20および1%BSA(牛血清アルブミン)を含むPBS緩衝溶液(pH7.4)に1時間浸す。BSA処理されたチップを、0.1%Tween20を含む緩衝溶液(pH7.4)で15分ずつ3回にわたり洗浄することにより、炭水化物チップの製作が完成される。

【0018】

前記製作された炭水化物チップは、蛋白質-炭水化物相互作用の研究に適用される。前記研究で、前記炭水化物チップは0.1%Tween20を含む緩衝溶液で1時間、非標識蛋白質またはフルオロフォア標識蛋白質とインキュベートされる。Cy3、Cy5およびFITC等の蛍光染料によって標識された蛋白質は商業的に利用可能であり、蛋白質と蛍光染料との反応により製造可能である。その後、結合しなかった蛋白質を除去するために、前記蛋白質処理チップは、0.1%Tween20を含む緩衝溶液で10分ずつ3回にわたり洗浄される。

【0019】

本発明の一つの実施形態において、前記表面上に固定された蛋白質と炭水化物との間の結合パターンが、標識または非標識の検出システムによって分析される。非標識の検出システムは、質量分析計および表面プラズモン共鳴撮像装置で構成された群から選択される。標識検出システムは、走査系器具およびCCDカメラを用いた器具で構成された群から選択される。前記試料は、ヒトまたは動物の、組織または血清、尿、乳、汗、骨髄およびリンパ液を含む体液である。

【0020】

本発明の別の態様において、前記の経路によって製造された炭水化物チップを利用して炭水化物に基づく疾病を診断する方法が提供される。診断可能な前記疾病は、遺伝疾病、癌、ならびにウイルスおよびバクテリア感染を含む。

【実施例】

【0021】

以下、本発明を次のような実施例によって更に詳しく説明する。説明された実施例は単に例示的なものとして全ての面で考慮されるべきであり、限定的なものではない。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

< 実施例 1 >

固体表面上における非修飾の炭水化物の固定化に必要な官能基の選択

【 0 0 2 3 】

本発明者らはまず、非修飾の炭水化物と非常に効果的且つ選択的に反応する官能基を選択した。非修飾の炭水化物とアミノオキシ基またはヒドラジド基との間の反応は、様々な複合糖質の合成に広く用いられている (Hatanaka, Y. et. al., J. Org. Chem. 2000, 65, 5639 ; Leteux, C. et. al., Glycobiology 1998, 8, 227 ; Zhao, Y. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997, 94, 1629)。したがって、本発明者らは、固体表面に非修飾の炭水化物を部位特異的に、および共有的に結合するために前記反応を用いた。

10

【 0 0 2 4 】

< 実施例 2 >

アミノオキシおよびヒドラジド修飾チップ基盤の製造

【 0 0 2 5 】

アミノオキシ基およびヒドラジド基によって修飾された固体表面を図 3 の提示の通りに製作する。手順を以下にて詳しく説明する。

【 0 0 2 6 】

アミノオキシチップ基盤を、次の三つの方法によって製作する (図 3 (a) 参照)。一番目に、アミンチップ基盤を化合物 b およびトリエチルアミン (T E A) と 1 2 時間反応させた後、3 % ヒドラジンと 3 ~ 6 時間反応させてフタロイル (P h t h) 保護基を除去することにより、短いリンカーが接続されたアミノオキシチップ基盤を製造する。二番目に、リンカー a (4 , 7 , 1 0 - トリオキサ - 1 , 3 - トリデカンジアミン) が接続されたアミノオキシチップ基盤の製作では、まずアミンチップ基盤と無水コハク酸とを 3 時間反応させる。その後、前記製作されたカルボン酸チップ基盤を、N - ヒドロキシコハク酸イミド (N H S) およびジイソプロピルカルボジイミド (D I C) と 3 時間反応させ、その後リンカー a と 3 時間反応させて前記表面上にアミン基を導入する。前記製作された長鎖のアミンチップ基盤を化合物 b と 1 2 時間反応させ、その後ヒドラジンと 3 ~ 6 時間反応させて、中間の長さのリンカーが接続されたアミノオキシチップ基盤を製作する。三番目に、リンカー a と c (ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル) が接続された最も長いアミノオキシチップ基盤の製作では、まずリンカー a が結合したアミンチップ基盤と、化合物 c とを p H 8 . 3 で 1 時間反応させてエポキシドを導入する。その結果物であるエポキシドチップ基盤をリンカー a と p H 8 . 3 で 3 時間反応させる。前記製作されたアミンチップ基盤を化合物 b と反応させた後のヒドラジン処理により、最も長いリンカーが接続されたアミノオキシチップ基盤を製作する。

20

30

【 0 0 2 7 】

ヒドラジドチップ基盤を、次の三つの方法によって製作する (図 3 (b) 参照)。一番目に、無水コハク酸との 3 時間の反応、N H S および D I C との 3 時間の反応、t - ブチルオキシカルボニル 6 - アミノヘキサン酸ヒドラジドとの 3 時間の反応、およびトリフルオロ酢酸 (T F A) との 1 時間の反応の連続的な反応によって、短いリンカーが接続されたアミンチップ基盤を製作する。二番目に、中間の長さのリンカーが接続されたヒドラジドチップ基盤を、アミノオキシチップ基盤の製作で説明したように、リンカー a が繋がれたアミノオキシチップ基盤を用いて製作する。前記アミノチップ基盤をコハク酸と反応させて前記表面にカルボン酸を導入し、更に D I C および N H S と反応させ、次にヒドラジンと 3 時間反応させ、中間の長さのリンカーが接続されたヒドラジドチップ基盤を提供する。三番目に、最も長いヒドラジドチップ基盤を、前記の説明の通り、エポキシド被覆チップ基盤から製作する。前記エポキシドチップ基盤をリンカー a と反応させ、続いて無水コハク酸、N H S および D I C 、 t - ブチルオキシカルボニル 6 - アミノヘキサン酸ヒドラジド、ならびに T F A と連続的に反応させて最も長いヒドラジドチップ基盤を生産する。

40

【 0 0 2 8 】

50

前記の様々な長さのリンカーがチップ基盤内に導入される理由は、蛋白質が固体表面上の炭水化物リガンドに結合する際に、立体障害および非特異的相互作用を最少化することができる方法を見出すためである。

【0029】

<実施例3>

固定化条件の最適化

【0030】

前記実施例2で製作されたアミノオキシ基およびヒドラジド基によって誘導体化された固体表面上に炭水化物を固定させるための条件(温度、時間、pHおよび濃度)を最適化するために実験を行った。

10

【0031】

<3-1> 最適固定化温度および時間

【0032】

固定化温度および時間を最適化するために、フコースおよびN, N'-ジアセチルキトビオース(30mM、30%グリセロールを含むpH5.0のリン酸ナトリウム緩衝溶液)の溶液を、アミノオキシ基またはヒドラジド基によって修飾された固体表面上に印刷し、その結果得られたチップを22、37または50でインキュベートする。1~21時間後、前記チップを、標識Aleuria aurantia(Cy5-AA)およびTriticum vulgare(Cy3-TV、wheat germ agglutininとしても知られている)または非標識蛋白質とインキュベートする。

20

【0033】

前記表面上の蛋白質と炭水化物との間の結合強度を、標識蛋白質の場合は蛍光スキャナまたは蛍光顕微鏡を用いて測定し、非標識蛋白質の場合は表面プラズモン共鳴撮像装置または質量分析計を用いて測定した。50で製作された炭水化物チップは、テストされた温度中で最も良い結果を表す。更に、50で12時間以上のインキュベート時間から得られた炭水化物チップは、蛍光強度の実質的な変化を表さない(図4参照)。よって、約12時間程度の固定化時間が固定化に最適である。

【0034】

<3-2> 最適固定化pHおよび濃度

【0035】

前記実施例<3-1>から得られた最適温度(50)および最適時間(12時間)で最適pHおよび濃度を調査する。

30

【0036】

具体的に、pH4~5で約30mM濃度の炭水化物濃度が効率的な固定化に理想的であることが見出される。また、固体表面上の炭水化物とアミノオキシ基またはヒドラジド基との間の共有結合は、緩衝溶液を用いた炭水化物チップの広範囲な洗浄がレクチン結合に影響を及ぼさないという観察を根拠に、非常に安定的であることが見出される。更に、実施例2の三番目の方法に従って製作された、最も長いリンカーが接続されたアミノオキシおよびヒドラジドチップは、より短いリンカーが繋がれたチップ基盤と比較して最善の結果を表す。

40

【0037】

<実施例4>

炭水化物チップの応用

【0038】

炭水化物チップは、様々な生物学的過程に関与し、新たな治療剤の開発、並びに腫瘍および病原菌等の炭水化物に基づく疾病の迅速な診断のために重要な炭水化物-蛋白質相互作用の迅速な評価のために用いられる。このような目的のために、下記表1に提示された21個の単糖類、二糖類、オリゴ糖および多糖類の各溶液(30%グリセロールを含むリン酸ナトリウム緩衝溶液、pH5.0)を、アミノオキシ基またはヒドラジド基によって被覆された固体基質に印刷した。実施例3で説明した前記方法で製作された炭水化物チッ

50

ブを、Cy3-TV、Cy5-AAおよびFITC-ConAとインキュベートした。蛍光スキャナで検出後に、チップ内のスポットの蛍光強度に従って、TVは、N,N'-ジアセチルキトビオース(13)に強く、GlcNAc(2)およびシアリルLe^x(19)にはさほど強くなく、そしてGalNAc(5)、LacNAc(15)およびNeuNAcLacNAc(18)には弱く結合する(図5(a)参照)。AAで処理された炭水化物チップは、レクチンがFuc(8)、FucLac(17)および六糖類(20)に強く結合するが、シアリルLe^x(19)には非常に弱く結合する(図5(b)参照)。ConAとインキュベートさせた炭水化物チップは、マンナン(21)にレクチンの強い結合を表すが、マンノビオース(16)にはさほど強くない結合を表し、そしてマルトース(11)には非常に弱い結合を表す(図5(c)参照)。

10

【0039】

シアリルLe^xは、重要な生物学的認識マーカーであり創薬のための興味深いターゲットである。血液内の糖蛋白質にシアリルLe^xを有するグリカンは、T細胞、内皮細胞または血小板に結合する。前記結合事象は急性および慢性炎症の原因になる(Somers, W.S. et al., Cell 2000, 103, 467; Wild M.K. et al., J. Biol. Chem. 2001, 276, 31602)。更に、シアリルLe^xは腫瘍関連炭水化物抗原の一つであると知られている(Hakamori, S. Adv. Cancer Res. 1989, 52, 257)。

【0040】

そのため、シアリルLe^xの検出およびシアリルLe^x結合蛋白質に関する阻害剤の開発は、基礎生物学的研究および創薬の両方にとって重要である。前記の方法によって製作された炭水化物チップを、シアリルLe^x結合蛋白質の検出に用いた。前記炭水化物チップを抗シアリルLe^x抗体とインキュベートした。前記チップの蛍光イメージは、シアリルLe^xがこのような抗体によって選択的に認識されることを表す(図5(d)参照)。

20

【0041】

病原菌を含む多くのバクテリアは、線毛(pili)上に特異的な炭水化物結合蛋白質を表す。特異的な炭水化物-蛋白質相互作用による宿主細胞への病原菌の最初の付着は、病原菌の特性を付与する。例えば、タイプ1の線毛状(fimbriated)E. coliのマンノース結合蛋白質は、宿主細胞上のグリカンへの結合により一般的な尿路感染の原因になると知られている(Connell, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 9827)。そのため、炭水化物チップもまた、診断のための病原菌の検出に用いた。線毛上にマンノース結合因子を発現するE. coli ORN 178は、マンノース、マンノビオースおよびマンナンを含むスポットに結合する(図5(e)参照)。

30

【0042】

【表 1】

<表1>

炭水化物チップの製作に用いられる炭水化物

| | | | | |
|------|---|-----|--|----|
| 単糖類 | 1. Glc 2. GlcNAc 3. GlcA 4. Gal 5. GalNAc 6. Man 7. ManNAc 8. Fuc 9. Rham 10. Xyl | 二糖類 | 11. マルトース 12. セロビオース 13. N, N' - ジアセチル キトビオース 14. ラクトース 15. Gal β 1, 4GlcNa c (LacNAc) 16. Man α 1, 6Man (マンノビオース) | 10 |
| オリゴ糖 | 17. Fuc α 1, 3(Gal β 1, 4)Glc (FucLac) 18. NeuNAc α 2, 3Gal β 1, 4GlcNAc (NeuNAcLacNAc) 19. シアリル Le ^x 20. Fuc α 1, 2Gal β 1, 3(Fuc α 1, 4) GlcNAc β 1, 3Gal β 1 , 4Glc | 多糖類 | 21. マンナン | 20 |

【0043】

前記で説明した通り、本発明者らは、誘導体化された固体基質上に部位特異的に、および共有的に非修飾の炭水化物を固定化させる、新規で効率的な炭水化物チップの製作方法を提供する。前記方法で製作された炭水化物チップを用いた蛋白質および細胞結合実験は、如何なる形態の炭水化物も、その大きさに関係なく、アミノオキシ基またはヒドラジド基によって誘導体化された固体表面上に効率的に固定化できることを証明する。更に、炭水化物チップは炭水化物 - 蛋白質相互作用の迅速な分析および炭水化物に基づく疾病の診断のための抗体および病原菌の検出に有用であることを表す。

30

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図 1】炭水化物チップの製作方法を示す概略図である。

【図 2】本発明の原理を説明する概略図である。

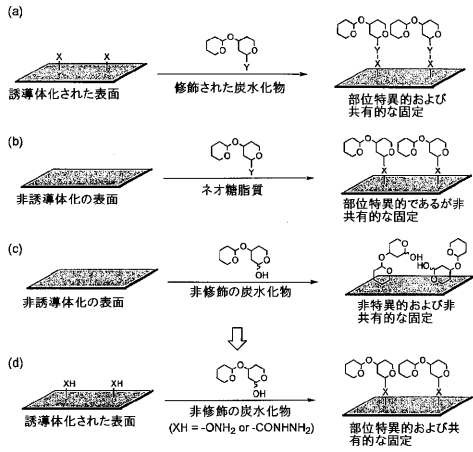
【図 3】様々な長さのリンカーを経由した (a) アミノオキシまたは (b) ヒドラジドで誘導体化された固体表面の製作を示すフローチャートである。

【図 4】(a) Cy 5 標識 AA および (b) Cy 3 標識 TV とのインキュベート後に、アミノオキシ (黒線) およびヒドラジド (赤線) によって被覆された固体表面上へのフォーカスおよび N, N' - ジアセチルキトビオースの固定化の時間依存を示すグラフである。

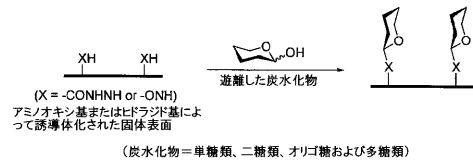
40

【図 5】(a) Cy 3 - TV、(b) Cy 5 - AA、(c) FITC - ConA、(d) 抗シアリル Le^x 抗体、および (e) ヨウ化プロビジウム (PI) でプレインキュベートされた E. coli でプローブされた 21 個の炭水化物からなる炭水化物チップの蛍光像である。

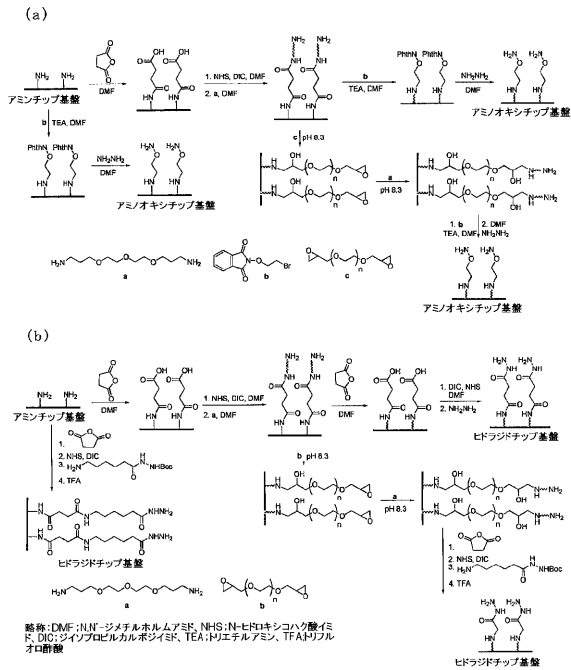
【 図 1 】



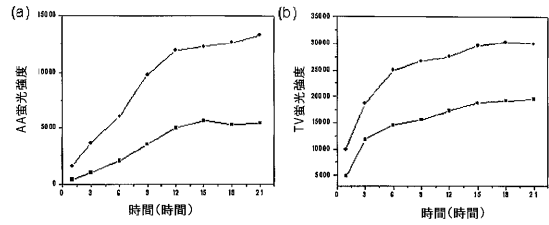
【 図 2 】



【 図 3 】

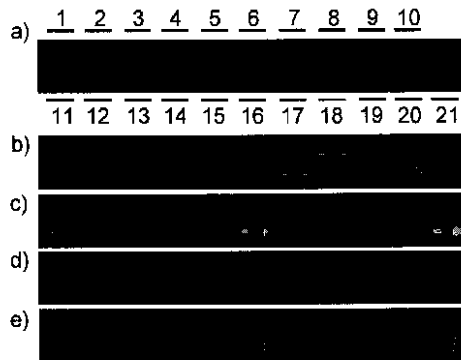


【 図 4 】



【 図 5 】

[Fig. 5]



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成19年10月30日 (2007.10.30)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 請求項 5



【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 請求項 5 】

前記固体表面は、シリコン、高分子、雲母、プラスチック、ガラス、金、紙、膜またはこれらの組み合わせで構成される群から選ばれることを特徴とする請求項 1 から請求項 4 のいずれか一項に記載の炭水化物チップの製作方法。

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/KR2005/002096 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| <i>C12Q 1/00(2006.01)i</i> | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC8 C12Q 1/00 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS, Delphion, NDSL, "carbohydrate, chip, microarray, hydrazide, aminoxy, etc." | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X Y | Injae Shin, et al., 'Carbohydrate microarrays: An advanced technology for functional studies of glycans', In: Chemistry, European Journal, 5 Jan 2005, Vol.11(10), pp.2894-2901 | 1, 2, 5 - 7, 9 - 15 3, 4, 8 |
| Y | Hoffman, W.L., et al., 'Site-specific immobilization of antibodies by their oligosaccharide moieties to new hydrazide derivatized solid supports', In: Journal of immunological methods, 1988, Vol.112(1), pp.113-120 | 1, 2, 5, 9 - 15 |
| Y | Matthew D.Disney, et al., 'Carbohydrate arrays as tools for the glycomics revolution', In: Drug discovery today: targets, Aug 2004, Vol.3(4), 151-158 | 1 - 15 |
| Y | Sungjin Park., et al., 'Carbohydrate chips for studying high-throughput carbohydrate-protein interactions', In: Journal of the American Chemical Society, 2004, Vol.126(15), pp.4812-4819 | 1 - 15 |
| A | Love, Kerry R., et al., 'Carbohydrate arrays as tools for glycomics', In: Angewandte Chemie, International Edition, 2002, Vol.41(19), pp. 3583-3586 | 1 - 15 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 06 FEBRUARY 2006 (06.02.2006) | | Date of mailing of the international search report 07 FEBRUARY 2006 (07.02.2006) |
| Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140 | | Authorized officer SHIN, Kyeong A Telephone No. 82-42-481-5589  |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|--|
| International application No. PCT/KR2005/002096 |
|--|

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 13 - 15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 13 - 15 of the present invention relate to a diagnostic method / Rule 39.1(iv).
Nevertheless, a search has been executed for these claims.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: 5
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

| | | |
|--------------|----------------------|------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
| | G 0 1 N 33/547 | |
| | G 0 1 N 33/543 5 9 5 | |
| | G 0 1 N 37/00 1 0 2 | |

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 リー、ミャン - リュル

大韓民国 4 1 2 - 2 2 0 コヤン トギャン - グ ヘンシン - ドン ヘットヴィット マール
 アパートメント 2 3 1 4 - 2 0 1

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 通过将未修饰的碳水化合物固定在衍生的固体表面上来制造碳水化合物碎片及其用途 | | |
| 公开(公告)号 | JP2008541011A | 公开(公告)日 | 2008-11-20 |
| 申请号 | JP2008508733 | 申请日 | 2005-07-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 勇说大学学术产业合作的基础 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 延世大学产业学术合作的基础 | | |
| [标]发明人 | シンインチェ リーマンリユル | | |
| 发明人 | シン、イン-チェ リー、マン-リユル | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/547 G01N37/00 | | |
| CPC分类号 | G01N33/66 B01J19/0046 B01J2219/00364 B01J2219/00387 B01J2219/00605 B01J2219/00659 B01J2219/00731 C40B40/12 C40B50/18 G01N2400/00 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.Z G01N33/543.525.W G01N33/543.525.U G01N33/543.525.E G01N33/545 G01N33/547 G01N33/543.595 G01N37/00.102 | | |
| 代理人(译) | 昂达诚 | | |
| 优先权 | 1020050038077 2005-05-06 KR | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及碳水化合物芯片的制造，其中游离碳水化合物固定在改性固体表面上。更具体地，本发明是酰肼基团或通过衍生化的固体表面上的氨基，碳水化合物不合格，其制造方法大小的位点特异性不管，和共价结合的碳水化合物芯片它涉及。根据本发明，碳水化合物不合格的，被有效地固定在有关其大小没有固体表面上，本发明的方法不需要修饰的碳水化合物，容易制造的碳水化合物芯片。本发明进一步的碳水化合物 - 涉及用于基于快速分析和碳水化合物蛋白质相互作用的疾病诊断制造的碳水化合物芯片应用。

